

••• förbättrad analysteknik

Ny efterlängttad teknologi

– *SuperRCA för ultrakänslig uppföljning av*



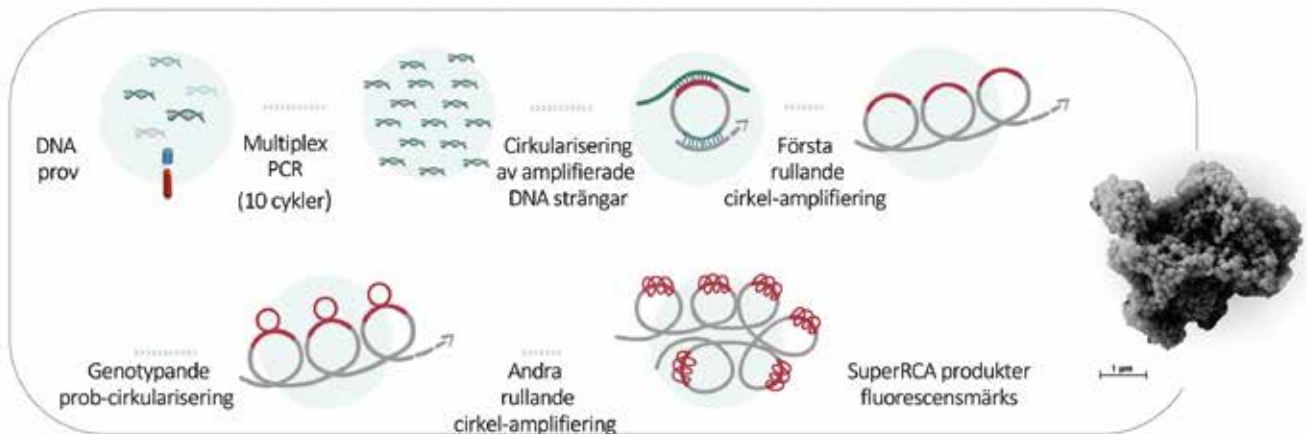
kan detektera **cancer** *leukemipatienter*

Med en helt ny, mycket känslig teknologi – så kallade superRCA-analyser – kan eventuella kvarvarande cancerceller påvisas efter behandling av akut myeloisk leukemi (AML). Metoden har presenterats i en artikel i Nature Communication.

Vid behandling av akut myeloisk leukemi brukar patienter svara bra på cytostatika-behandlingar, men det finns en stor risk för återfall i sjukdomen inom två år. Sällsynta tumörspecifika mutationer i patientprover fungerar som utmärkta markörer för att övervaka förloppet av maligna sjukdomar och svar på behandlingen. Behovet av förbättrade analystekniker för bred användning är därför stort.

Nu har forskare vid Uppsala universitet tagit fram en mycket känslig och selektiv teknologi, så kallade superRCA-analyser, som snabbt och mycket specifikt kan detektera cancerspecifika DNA-mutationer i mycket låga frekvenser i DNA-prover. Här beskrivs den nya möjligheten av **Anna Eriksson** och **Ulf Landegren**, båda verk samma forskare vid Uppsala universitet.

••• förbättrad analysteknik



DNA-provet genomgår först en initial multiplexamplifiering där valda DNA-sekvenser amplifieras genom 10 PCR-cykler. Därefter konverteras de amplifierade sekvenserna till DNA-cirklar som genomgår en första omgång rullande cirkelamplifiering. Denna reaktion ger upphov till DNA-strängar, var och en med hundratals komplement till DNA-cirklarna. Därefter tillsätts genotypningsprober som omvandlas till DNA-cirklar, beroende på om de korrekt detekterat normal respektive muterad sekvens. Detta steg resulterar i hundratals DNA-cirklar länkade till varje DNA-sträng. De många kopiorna i varje DNA-sträng gör att genotypningen blir näst intill perfekt då individuella fellageringar får minimal påverkan på den totala signalen. I sista steget utsätts sedan även de cirkulariserade genotypningsproberna för rullande cirkelamplifiering. De två på varandra följande rullande cirkelamplifieringsreaktionerna resulterar för varje ursprunglig cirkulariserad PCR-produkt i ett stort DNA-nystan. Dessa nystan är i samma storleksordning som små celler. Efter fluorescensmärkning kan nystan som representerar normala respektive muterade sekvenser räknas med hög precision in en konventionell flödescytometer.

Patienter som diagnostiseras med akut myeloisk leukemi (AML), alternativt med myelodysplastiskt syndrom (MDS) som har en relativt hög risk att transformera till AML, ställs snabbt inför en livshotande situation med komplex behandling.

Majoriteten av AML-patienter som erhåller intensiv kemoterapi går i komplett remission, vilket innebär att mängden leukemiska myeloiska blaster understiger fem procent i benmärgen. Trots detta ligger femårsöverlevnaden för AML-patienter bara runt 20–30 procent^{1,2}. Orsaken till detta är i första hand tidiga, aggressiva och mycket svårbehandlade återfall där flertalet inträffar under de första två åren. Detta faktum visar tydligt att den konventionella definitionen av remission inte räcker för att optimera patienternas behandling.

Påvisade genetiska avvikelser i leukemicellerna bär viktig prognostisk information. Flera återkommande genmutationer, inklusive NPM1, FLT3 och TP53, används i dagens riskstratifiering och hjälper till att styra behandlingen^{2,3}. Liksom vid många solida tumörer inträffar flera av de vanligast förekommande mutationerna vid AML och MDS i gener kopplade till epigenetisk genreglering, till exempel DNMT3A, IDH 1 och 2 samt ASXL1^{4,5}. Den ökande kunskapen om bakomliggande molekylära mekanismer vid AML har också möjliggjort flera nya målinriktade läkemedelsterapier, till exempel med tyrosinkinashämmare riktade mot IDH1, IDH2 och FLT3.

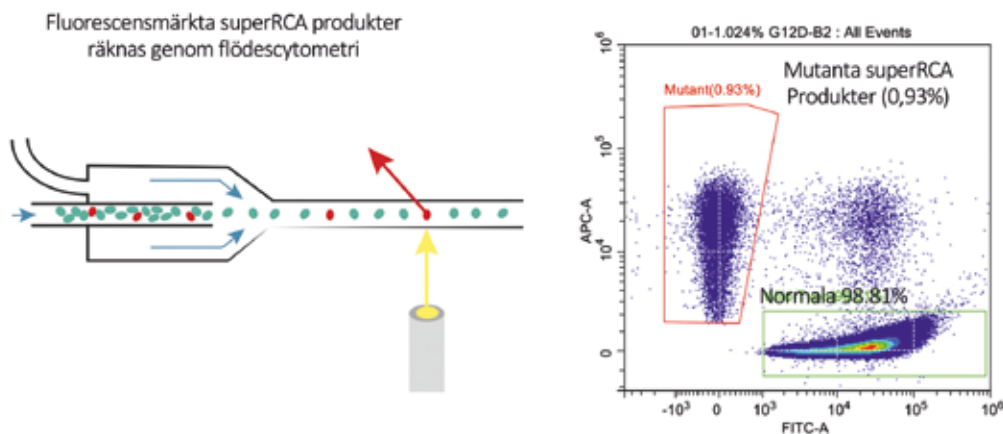
ÅTERFALL STÖRSTA UTMANINGEN

Sjukdomsåterfall utgör en av de största utmaningarna vid behandling av AML. Flera studier har påvisat det starka prognostiska värdet i att kunna bedöma också mycket låga nivåer av kvarvarande leukemiska celler, så kallad measurable residual disease (MRD), där MRD-negativitet är starkt kopplat till positivt utfall för patienten^{6,7}. I dagsläget används framför

” Det skulle vara en stor fördel för såväl patienter som sjukvården om MRD med hög känslighet kunde detekteras i blod i stället för som idag genom benmärgsprov.

allt flerfärgs-flödescytometri för att identifiera antikroppsinfärgade maligna celler, alternativt kan genfusioner påvisas genom qRT-PCR^{6,7}. Den huvudsakliga provkällan för MRD-analys vid AML är i dagsläget benmärg. Redan idag används MRD-information för att styra behandlingsbeslut, i synnerhet huruvida patienten bör genomgå en allogen stamcellstransplantation som del av den konsoliderande behandlingen. I precisionsmedicinens tidevarv och med ett terapeutiskt landskap där fler riktade behandlingsalternativ blir tillgängliga kommer MRD med stor sannolikhet få en alltmer central roll i behandlingsbesluten. Det skulle vara en stor fördel för såväl patienter som sjukvården om MRD med hög känslighet kunde detekteras i blod i stället för som idag genom benmärgsprov.

SuperRCA är en ny detektionsteknik utvecklad vid Uppsala universitet⁸. Tekniken gör det möjligt att påvisa extremt låg förekomst av DNA med specifika mutationer mot en bakgrund av normala sekvensvarianter. Tekniken utnyttjar två på varandra följande steg av rullande cirkel-amplifiering (RCA), för att genetiskt typa och samtidigt förstora enskilda DNA-molekyler till DNA-nystan som är stora nog att kunna räknas i de flödescytometrar som idag används i sjukvården



för att räkna fluorescens-märkta celler. Processen har automatiserats så att man redan tre timmar efter att ett DNA-prov tagits fram, snabbt kan undersöka i storleksordningen en miljon DNA-nystan i flöde för att räkna förekomsten av muterade varianter med extremt hög precision.

I den aktuella studien skapades en 12-plex superRCA-panel omfattande nio singel-nukleotid-mutationer (*IDH1 p.R132C*, *IDH1 p.R132H*, *IDH2 p.R140Q*, *IDH2 p.R172K*, *TP53 p.R248Q*, *PTPN11 p.A72T*, *DNMT3A p.S714C*, *DNMT3A p.R882C* och *BCORL1 p.Q1039**), 2 insertioner (*NPM1 p.W288fs* och *ASXL1 p.G646fs*12*) och 1 deletion (*BCOR p.M1641fs*50*). Ovanstående mutationer valdes för att de är vanligt förekommande vid AML och MDS, men också då de är av olika typ, har olika prognostiskt värde samt att det i vissa fall finns målinriktade terapier som fokuserar just på den aktuella avvikelser⁸. För benchmarking av metoden valde vi att fokusera på IDH-mutationer. Inicialt preparerades spädningsserier av genomiskt DNA från olika IDH-muterade cellinjer. Samtliga spädningar analyserades därefter med hjälp av superRCA och med digital droplet PCR (ddPCR). De initiala cellinjestudierna visade att superRCA kunde detektera IDH-mutationerna mot ett 100 000-faldigt överskott av DNA från normala celler, långt känsligare än med ddPCR.

Vi gick vidare och analyserade de fyra utvalda IDH-mutationerna i totalt 44 primära benmärgsprover tagna vid diagnos från patienter med myeloiska maligniteter. För jämförelse med konventionella metoder analyserades samtliga prover med superRCA (Rarity Bioscience), ddPCR (Bio-Rad) och next-generation sequencing (NGS, Illumina). SuperRCA detekterade muterat DNA med en 10–100 gånger högre känslighet jämfört med ddPCR. Samtliga IDH-mutationer som påvisats via NGS under den primära kliniska utredningen detekterades också med superRCA, men hos två av de undersökta patienterna upptäcktes även en andra, tidigare icke rapporterad IDH-mutation.

MÅNGA GÅNGER KÄNSLIGARE

Vi analyserade flera konsekutiva prover från tre patienter med hjälp av superRCA, ddPCR och NGS. Syftet var att jämföra blod vs benmärg som provkälla men också att undersöka superRCAs känslighet för låggradig MRD-positivitet i primära patientprover. Denna analys bekräftade fynden från tidigare cellinjestudier, det vill säga att superRCA var 10–100 gånger

” **En av de aktuella patienterna bedömdes vid remissionsutvärdering i samband med behandlingsavslut vara MRD-negativ på basen av NGS-analys, medan såväl ddPCR som superRCA påvisade kvarvarande sjukdom.**

känsligare än ddPCR, och metoden var ytterligare en 10-potens känsligare än NGS. En av de aktuella patienterna bedömdes vid remissionsutvärdering i samband med behandlingsavslut vara MRD-negativ på basen av NGS-analys, medan såväl ddPCR som superRCA påvisade kvarvarande sjukdom. Patienten fick sedermera ett kliniskt återfall. I denna longitudinella studie undersöktes såväl benmärgs- som blodprover tagna först vid diagnostillfället och senare då patienten var i klinisk remission samt i förekommande fall också vid sjukdoms-återfall. I samtliga fall då mutationer påvisades i benmärgs- aspirat kunde superRCA också detektera kvarvarande IDH-mutationer i blod.

Mutationer i GC-rika regioner i arvsmassan utgör en speciell utmaning vid genetisk diagnostik. Detta gäller till exempel den vid AML och MDS vanligt förekommande *ASXL1 p.G646fs*12*-mutationen som befinner sig i en region med 85 procent GC, och där det gäller att skilja mellan sekvensvarianter med endera åtta eller nio G-nukleotider i följd. Känsligheten vid konventionell NGS-analys för denna krävande mutation ligger runt en variant allel-frekvens (VAF) på omkring fem procent⁹. Efter initiala spädningsserier med *ASXL1*-muterade cellinjer utvärderades primära patientprover från fyra patienter med AML eller MDS som alla verkade bära på den aktuella *ASXL1*-mutationen. Benmärgsprov från två av patienterna visade vid superRCA-analys positivitet för den aktuella *ASXL1*-mutation med mutationsfrekvenser på 32 procent respektive 24 procent, vilket korresponderade väl med tidigare rapporterat resultat från NGS-analysen. För de två

andra patienterna resulterade NGS-analysen i en VAF runt metodens detektionsgräns fem procent. Mutationen kunde dock ej påvisas med den känsligare superRCA-tekniken. Den höga bakgrunden vid NGS-analys för ASXL1 p.G646fs*12 är välkänd sedan tidigare och NGS-fyndet betraktas därför som falskt positivt.

” Allteftersom fler och fler målinriktade terapier blir tillgängliga, såsom till exempel IDH-hämmare som kan tas i tablettform, förbättras möjligheter att erbjuda mer skonsamma behandlingsalternativ också vid lågradig kvarvarande sjukdom.

KAN RESULTERA I MARKÖRER

I en nära framtid kommer tumörpatienter i allt högre grad få sina maligniteter sekvenserade, vilket både kan styra behandlingsval och även resultera i utmärkta, tumorspecifika markörer för att övervaka sjukdomsförlopp. Påvisande av kvarvarande eller återkommande MRD har stor betydelse för den kliniska handläggningen av patienter med AML och MDS. Detta faktum ställer dock höga krav på såväl känslighet som specificitet hos de metoder som används. MRD-positivitet påverkar i dag beslut kring typ av behandling, behandlingens längd, huruvida patienten bör genomgå en allogen stamcells transplantation eller ej, samt också hur snabbt man ska försöka sätta ut immunsuppressiva läkemedel efter genomgången transplantation. Känsligare detektionsmetoder har förutsättningar att säkrare och tidigare påvisa återfall, så att patienten snabbt kan erbjudas lämplig behandling.

Återfall utgör ett av de stora kliniska problemen vid AML och högrisk-MDS. Behovet av tät MRD-monitorering är särskilt angelägen under den första tvåårsperioden då risken för återinsjuknande är störst. Dagens MRD-analyser genomförs som regel på benmärgsprov vilket sätter gränser för hur tätt man kan monitorera patienter. Säker MRD-analys i betydligt lättillgängligare venprov skulle därför innebära en stor fördel, särskilt för patienterna och göra det möjligt att korta monitoreringsintervallen.

Allteftersom fler och fler målinriktade terapier blir tillgängliga, såsom till exempel IDH-hämmare som kan tas i tablettform, förbättras möjligheter att erbjuda mer skonsamma behandlingsalternativ också vid lågradig kvarvarande sjukdom.

Det är troligt att högkänsliga analyser av tumör-specifika mutationer i blod kommer att bli allt vanligare, inte bara vid leukemier utan också i form av liquid biopsy vid solida tumörer som tenderar att läcka DNA till blodet. Sådana analyser kan komma att användas alltmer för att ställa in patienter på rätt behandling, och för långtidsuppföljning. Känsliga och lättillgängliga metoder såsom superRCA kan därför få en mycket viktig roll i vården av tumörpatienter.

REFERENSER

1. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* 2009; 113(18): 4179-87.
2. Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017; 129(4): 424-47.
3. Dohner H, Wei AH, Appelbaum FR, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* 2022; 140(12): 1345-77.
4. Eriksson A, Lennartsson A, Lehmann S. Epigenetic aberrations in acute myeloid leukemia: Early key events during leukemogenesis. *Exp Hematol* 2015; 43(8): 609-24.
5. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer cell* 2010; 18(6): 553-67.
6. Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine* 2018; 378(13): 1189-99.
7. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood* 2018; 131(12): 1275-91.
8. Chen L, Eriksson A, Westrom S, et al. Ultra-sensitive monitoring of leukemia patients using superRCA mutation detection assays. *Nat Commun* 2022; 13(1): 4033.
9. Alberti MO, Srivatsan SN, Shao J, et al. Discriminating a common somatic ASXL1 mutation (c.1934dup; p.G646Wfs*12) from artifact in myeloid malignancies using NGS. *Leukemia* 2018; 32(8): 1874-8.

ANNA ERIKSSON, SEKTIONEN FÖR HEMATOLOGI, VO BLOD- OCH TUMÖRSJUKDOMAR, AKADEMISKA SJUKHUSET, UPPSALA SAMT INSTITUTIONEN FÖR MEDICINSKA VETENSKAPER, UPPSALA UNIVERSITET, ANNA.ERIKSSON@MEDSCI.UU.SE



ULF LANDEGREN, INSTITUTIONEN FÖR IMMUNOLOGI, GENETIK OCH PATOLOGI, SCIENCE FOR LIFE LAB, UPPSALA UNIVERSITET, ULF.LANDEGREN@IGP.UU.SE

